

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-262780

(43)公開日 平成4年(1992)9月18日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

C 12 N 5/06

// C 12 M 3/00

識別記号

序内整理番号

F I

技術表示箇所

Z 9050-4B

7236-4B

C 12 N 5/00

E

審査請求 未請求 請求項の数2(全4頁)

(21)出願番号 特願平3-22276

(22)出願日 平成3年(1991)2月15日

(71)出願人 000004455

日立化成工業株式会社

東京都新宿区西新宿2丁目1番1号

(72)発明者 小田川 泰久

茨城県つくば市和台48番 日立化成工業株

式会社筑波開発研究所内

(72)発明者 守川 俊英

茨城県つくば市和台48番 日立化成工業株

式会社筑波開発研究所内

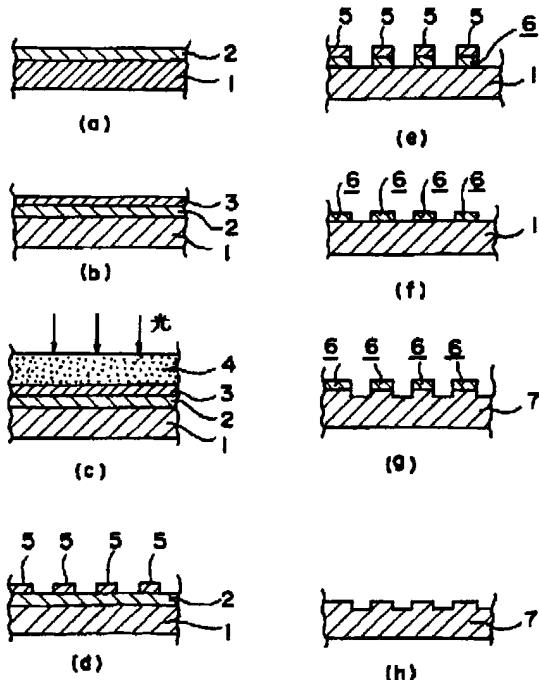
(74)代理人 弁理士 若林 邦彦

(54)【発明の名称】 神経線維の成長方向を制御する素子及びその製造法

(57)【要約】

【目的】表面に微細起伏を刻設した合成樹脂製の素子で、神経線維を微細起伏のパターンに沿って成長させる場合に適する。

【構成】合成樹脂板1の上にアルミニウム2を蒸着したのち、これにフォトレジスト3を塗布し、フォトマスク4をかぶせて露光する。現像液でレジストの露光部を洗い流してレジストパターン5を形成させ、腐食液で金属膜6をエッチングする。エッチング後の金属膜6の上に残ったレジストパターン5を溶剤で洗い流す。金属膜6のパターンをもつ合成樹脂板1を、酸素反応性イオンエッチング法で処理し、腐食液で金属膜を除去する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】合成樹脂から成り、多数の微細起状を刻設した表面を有する素子であって、微細起状の表面の親水性が山部よりも溝部で高いものである神経線維の成長方向を制御する素子。

【請求項2】合成樹脂板に金属蒸着膜を形成し、その上にレジストのパターンを形成し、そのレジストのパターンをマスクとして金属蒸着膜をエッチングし、次いでレジストを除去して得られた金属蒸着膜のパターンをマスクとして、合成樹脂をエッチングすることを特徴とする、請求項1記載の神経線維の成長方向を制御する素子の製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、合成樹脂製の神経線維の成長方向を制御する素子及びその製造法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】神経細胞を人工環境下で培養し、その成長を人為的に制御することは、脳・神経系の機能を解明する上にも、また神経細胞をコンピュータなどの情報処理素子として利用する上にも重要なことである。神経細胞は、胎生期などの一時期を除いて増殖しないこと、長い軸索や複雑な樹状突起をもつ形態のため生体からとり出す際に損傷を受けやすいため、また生存あるいは神経線維の成長に微量の成長因子が必要なこと、などの理由により試験管内で培養することが困難な細胞であった。しかし、近年の解剖学や組織培養学の進歩と神経成長因子(NGF)の発見及び利用によって、神経細胞の培養も次第に容易になってきた。更に最近では培養した神経細胞の成長を制御すること、例えば神経線維の成長方向を制御することも可能となってきた。

【0003】神経線維の成長方向を制御する方法としては、従来、フィプロネクチン、ラミニン、及びコラーゲン等のタンパク質やポリオルニチン及びポリリジン等のポリペプチドをシャーレ上に帯状にプリントし、それに沿って神経線維を成長させる方法〔エキスペリメンタル・セル・リサーチ(Exptl. Cell Res.)98巻, 159-169頁, 1976年〕、NFGの濃度勾配の方向に神経線維を成長させる方法〔ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー(J. Cell Biol. 111.)87巻, 546-554頁, 1980年〕、微弱電流の方向に成長方向を変える方法〔ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス・リサーチ(J. Neurosci. Res.), 13巻, 245-256頁, 1985年〕などがあった。

【0004】またリソグラフィー法とイオンエッチング法を組み合わせた方法で、石英ガラスの表面に規則的な溝構造を形成した素子をつくり、この溝の方向に沿って神経線維を伸ばす方法も、ブレイン・リサーチ(Brain Res.)446巻, 189-194頁, 1985年

10

20

30

40

50

8年、及び特開昭63-119754号公報で提案されている。更にまた、本発明者らは、表面に多数の微細起状を刻設したスタンパーを作製し、これを用いて合成樹脂で成形された神経線維の成長を制御する素子及びその製造法(特開平2-265477号公報)を提案している。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかし、タンパク質やポリペプチドのプリントに沿って神経線維を成長させる方法は変性しやすい高分子を用いるため保存性に問題があり、NFGの濃度勾配による方法は極めて高度なテクニックが必要で再現性に問題があり、微弱電流による方法は細胞への電場の影響が充分に解明されていない問題がある。また、特開昭63-119754号公報に開示されている、表面に溝構造を有する石英ガラスの素子上に神経線維を成長させる方法や、特開平2-265477号公報に開示されている合成樹脂製の素子上に神経線維を成長させる方法は、神経線維の伸長方向がおおよそ溝方向に沿ってはいるものの、溝を横切って伸長する神経線維も観察され、伸長方向の厳密性は未だ満足できるものではない。本発明は、神経線維の成長方向を更に厳密に制御する素子及びその製造法を提供するものである。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、合成樹脂から成り、多数の微細起状を刻設した表面を有する素子において、微細起状の溝の部分を酸素反応性イオンエッチング又は酸素プラズマ処理等のエッチングにより表面の親水性を上げ、溝と山の部分の親水性(疎水性)の差の大きな素子とすれば神経線維は更に厳密に細条溝の方向に沿って成長することを見出したに基づく。本発明の素子は図1に示すように、生体組織ないし細胞と接する部分に多数の微細起伏を刻設した表面を具えてなるものである。図1に示す素子は、微細起伏が細条溝で、細条溝が幅0.1~1000μm、深さ0.1~1000μmの寸法を有し、細条溝が互いに平行に構成されている。素子の全体形状は、図1に示すような板状のみでなく、皿状、球状、繊維状、筒状、粒子状でも良い。微細起伏は細条溝ばかりでなく敷石状のものであっても良い。細条溝は直線状、曲線、波状であっても良く、それらは平行だけでなく、複雑な形状であっても良い。細条溝の断面形状もU字形、V字形、ばち形等任意のもので良い。

【0007】この素子は、神経線維を細条溝等に沿って配向成長させることができる。本発明で用いられる合成樹脂は、神経線維が成長できるもので、かつ酸素反応性イオンエッチングもしくは酸素プラズマ処理等の方法でエッチングできる樹脂がよい。そのような合成樹脂としては例えば、ポリアクリレート樹脂、ポリメタクリレート樹脂、ポリスチレン樹脂等が挙げられる。本発明の素

子の製造法を図2により説明する。合成樹脂板1にスパッタ蒸着、真空蒸着等により金属を蒸着する(図2(a))。蒸着した金属膜2の上にフォトレジスト3をスピンコートで塗布し(図2(b))、望みのパターンを描いたフォトマスク4をかぶせて露光する(図2(c))。現像液でレジストの露光部を洗い流してレジストパターン5を形成し(図2(d))、金属膜2を腐食液でエッチングする(図2(e))。金属膜の上に残ったレジストパターン5を溶剤で洗い流す。これでフォトマスクのパターンを写しつけた金属膜のパターンをもつ合成樹脂板1(図2(f))ができる。この金属膜のパターンをもつ合成樹脂板を酸素反応性イオンエッチングもしくは酸素プラズマ処理等でエッチングし(図2(g))、腐食液で金属膜6を除去するとフォトマスク4のパターンを転写した合成樹脂からなる素子7(図2(h))が完成する。

【0008】合成樹脂板に蒸着する金属は、合成樹脂面との接着性が良く、エッチングが容易なものがいい。アルミニウム、銅、クロム、ニッケル等が使用できるが、アルミニウムが特に好ましい。フォトマスクに描かれるパターンは、例えば1~1000μmの適当な間隔(顕微鏡で観察可能であればよい)、好ましくは5~50μmの間隔に配置した平行直線、波形曲線、同心円又は格子状絞り、長方形又は円等を平行直線で結んだ回路状絞り等、単純なものから複雑なものまで任意のパターンが可能である。

#### 【0009】

【作用】合成樹脂板上の神経線維の成長を促進する重要な因子として、合成樹脂表面の親水性・疎水性があり、この親水性・疎水性は合成樹脂板に落した水滴の接触角で表すことができる。いっぽう、合成樹脂は酸素反応性イオンエッチング法又は酸素プラズマ法で処理されると、その表面に酸素が導入され親水性が増加することが知られている。そこで、何も処理しないときに神経線維の成長にとっては最適な疎水性をもつ合成樹脂板を用いて、これを上記の酸素反応性イオンエッチング法又は酸素プラズマ法により微細起状の溝の部分だけをエッチングすれば、神経線維の成長に最適な疎水性の山と、その成長に不適当な親水性の溝部をもつ、神経線維の成長を制御できる素子が得られるわけである。なお、後述の実施例で用いたトリシクロデカニルジメチルジアクリレート樹脂板の接触角は酸素反応性イオンエッチング処理により68°から23°に減少することがあらかじめわかっていたものである。

#### 【0010】

【実施例】縦2cm、横2cm、厚さ0.5mmのトリシクロデカニルジメチルジアクリレートの樹脂板にアルミニウムを膜厚が約0.1μmとなるように真空蒸着した。このときの真空蒸着の条件は、圧力2×10<sup>-5</sup>Torr、蒸着金属量は5Å/secで、抵抗加熱により行 50

った。これに、フォトレジストAZ1350J(ヘキスト社製商品名)をスピンコートした。次いで、10μmの等間隔平行直線のスリットを有すフォトマスクをかぶせ、光量35mJ/cm<sup>2</sup>で露光した後、現像液AZデベロッパー(ヘキスト社製商品名)で洗浄してレジストパターンを形成させた。露出したアルミニウムをリン酸で、液温40°Cで処理して除去したのち、レジスト剥離液AZリムーバー100(ヘキスト社製商品名)でレジストパターンを除去し、10μmの等間隔のアルミニウム膜のパターンをもつ樹脂板を作製した。このようにして得られたアルミニウム膜のパターンをもつ樹脂板を酸素反応性イオンエッチング法でエッチングし(反応条件は電力200W、圧力0.1Torr、処理時間3min)、そののち、アルミ膜をリン酸で除去して、溝幅10μm、間隔10μm、深さ1μmの微細溝構造をもつ素子を作製した。

【0011】この素子を用いて、成熟マウスから採取した脊隨後根神経節細胞を培養した。培養液は、ハム(Ham)F-12培地とダルベッコ(Dulbecco)MEM培地との1:1混合液にブロゲステロン(30mM)、インシュリン(5mg/l)、トランスフェリン(100mg/l)及びNGF(7S-NGF 200μg/l)を添加したものを使用し、5%CO<sub>2</sub>雰囲気下、37°Cで48時間培養した後、顕微鏡で神経線維の成長を観察した。その結果、神経線維は細条溝の山の部分上に、微細溝の方向に沿って成長しているのが観察された。神経線維をよく伸ばしている10個の細胞を平均すると、神経線維の山の部分上の分布率は95%で、神経線維が溝方向へ伸びている長さと溝方向と垂直方向へ伸びている長さの比は15.1であった。

#### 【0012】

【発明の効果】本発明の素子は、神経線維の成長方向を従来よりも更に厳密に制御できる。また石英ガラスと異なり加工しやすいので、神経修復材料等の医療用具に応用できる。また、本発明の素子の製造法は、リソグラフィー法、反応性イオンエッチング法等の微細加工技術を応用したもので、同様の構造・形状の素子を何個でも安定して製造することができる。

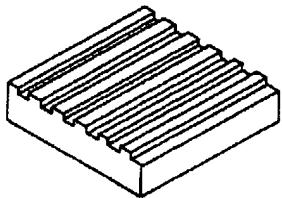
#### 【図面の簡単な説明】

図1は本発明の素子の斜視図を示す。図2は本発明の素子の製造法を示す断面図である。

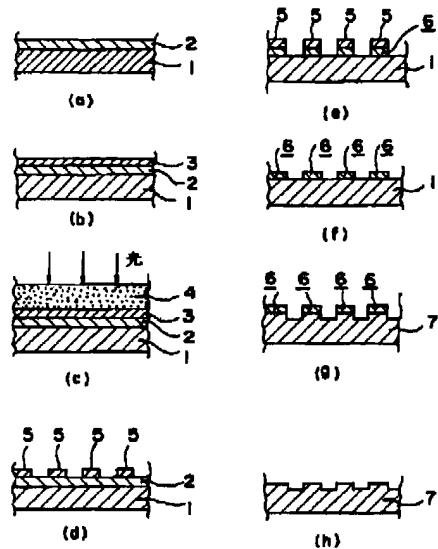
#### 符号の説明

- 1…合成樹脂板
- 2…金属膜
- 3…フォトレジスト
- 4…フォトマスク
- 5…レジストのパターン
- 6…レジストのパターンを写しつけた金属膜
- 7…微細溝構造を有す素子

【図1】



【図2】



PTO 04-3888

Japanese Kokai Patent Application  
No. Hei 4[1992]-262780

DEVICE REGULATING GROW DIRECTION OF NERVE FIBER AND METHOD FOR  
MAKING THE SAME

Yasuhisa Odakawa  
Shuhei Morikawa

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE  
WASHINGTON, D.C. JUNE 2004

100-021983-32

TRANSLATED BY THE RALPH MCELROY TRANSLATION COMPANY

JAPANESE PATENT OFFICE  
PATENT JOURNAL (A)  
KOKAI PATENT APPLICATION NO. HEI 04[1992]-262780

Int. Cl. <sup>5</sup> :	C12N 5/06 //C12M 3/00
Sequence Nos. for Office Use:	9050-4B 7236-4B
Filing No.:	Hei 03[1991]-22276
Filing Date:	February 15, 1991
Publication Date:	September 18, 1992
No. of Claims/Inventions:	2 (Total 4 pages)
Examination Request:	Not filed

**DEVICE REGULATING GROW DIRECTION OF NERVE FIBER AND METHOD FOR  
MAKING THE SAME**

[Shinkeiseni noseicho o seigyo suruso shiyo besono seizoho]

Inventors:	Yasuhisa Odakawa Shunei Morikawa
Applicant:	000004455 Hitachi Chemical Co., Ltd.

[There are no amendments to this patent.]

Claims

1. A device regulating grow direction of nerve fiber, comprising a synthetic resin substrate having a surface engraved with a large number of fine grooves with the groove part having higher hydrophilicity than the ridge part on the surface.
2. A method for the manufacture of a device controlling grow direction of nerve fiber described in Claim 1, characterized by the forming of a metal vapor deposition film on a synthetic resin plate, followed by the forming of a resist pattern, the etching of the metal vapor

deposition film using the resist pattern as a mask, then the etching of the synthetic resin using the metal vapor deposition film pattern obtained by removing the resist, as the mask.

#### Detailed explanation of the invention

[0001]

##### Industrial application field

The present invention concerns a synthetic resin device for controlling grow direction of nerve fiber and a method for making the same.

[0002]

##### Prior art

Incubation of nerve fiber in an artificial environment and under artificial control of its growth is important for understanding the function of the brain and nervous system and utilizing nerve cells as information processing devices such as computers, etc. Nerve cells do not grow except in a certain period such as the embryonic period, and due to their elongated axis and complex branch-like protrusions, they can be easily damaged when removed from body; minute growth factor is needed for living and nerve fiber growth, thus growing these cells in test tubes is very difficult. However, with recent progress in anatomy and tissue growth and the discovery and utilization of nerve growth factor (NGF), nerve cell growth is becoming easier. More recently, control of the growth of incubated nerve cells, e.g., control of the growth direction of nerve fiber, has become possible.

[0003]

Conventional methods for controlling the growth direction of nerve fiber include printing of proteins such as fibronectin, laminin, collagen, etc., and polypeptides such as polyornithin, polylysine, etc., in bands and growing the nerve fiber along the print (Experimental Cell Res., vol. 98, p.159-69, 1976); growth of nerve fiber in the direction of an NGF concentration gradient (J. Cell. Biol., vol. 87, p.546-54, 1980); changing growth direction by weak current (J. Neurosci. Res., vol. 13, p.245-56, 1985), etc.

[0004]

According to Brain Res., vol. 446, p.189-94, 1988, Japanese Kokai Patent No. Sho 63[1988]-119754, a device with a regular groove structure on a quartz glass surface can be prepared by lithography and ion etching in combination, and nerve fiber can be extended along the groove direction. We prepared a stamper having a large number of grooves on the surface and

proposed its use for a device controlling growth of nerve fiber formed on synthetic resin and a method for making the same (Japanese Kokai Patent No. Hei 02[1990]-265477).

[0005]

Problems to be solved by the invention

However, in growing nerve fiber along the protein or polypeptide print, unstable polymer with storability problems is used. The NGF concentration gradient method requires a very high level technology with problems in reproducibility. The weak current method has problem of no clear understanding of the effects of electric fields on cells. In the method of growing nerve fiber on a quartz glass device having a groove structure on the surface disclosed in Japanese Kokai Patent No. Sho 63[1988]-119754 and the method of growing nerve fiber on a synthetic resin device disclosed in Japanese Kokai Patent No. Hei 02[1990]-265477, the extension direction of nerve fiber is along the groove direction, while nerve fiber extending across the groove is also observed, so the extension direction precision is not satisfactory. The present invention is to provide a device capable of more precise control of the growth direction of nerve fiber and a method for making the same.

[0006]

Means to solve the problem

The present invention is based on the discovery that when a device is made from a synthetic resin with a large number of fine grooves on the surface and the surface hydrophilicity of the groove part is enhanced by oxygen reactive ion etching or oxygen plasma treatment, etc., for a large hydrophilicity (hydrophobicity) difference between groove and ridge, nerve fiber can be grown precisely along the fine groove direction. As shown in Figure 1, the device of the present invention provides a surface with a large number of fine grooves for the part to be contacted with body tissue and cells. The device shown in Figure 1 has fine grooves with a width of 0.1-1000  $\mu\text{m}$  and a depth of 0.1-1000  $\mu\text{m}$  with grooves in parallel. Besides the plate form shown in Figure 1, the device may be in the shape of trays, spheres, fibers, cylinders, particles, etc. The fine undulation may not have to be fine grooves, and it can be paving stone shaped. The fine grooves may be linear, curved, or wavy, and they may be parallel or in any other complex form. The fine grooves may be in a U shape, V shape, stick shape, etc.

[0007]

With this device, nerve fiber grows oriented along the fine grooves. Nerve fiber can be grown on synthetic resins used in the present invention. Preferred resins can be etched by oxygen reactive ion etching or oxygen plasma treatment. Such synthetic resins are, e.g., polyacrylate

resins, polymethacrylate resins, polystyrene resins, etc. Preparation of the device of the present invention is explained with Figure 2. A synthetic resin plate (1) is coated with metal vapor by sputter vapor deposition, vacuum vapor deposition, etc. [Figure 2(a)]. A photoresist (3) is spin-coated on the metal vapor deposition film (2) [Figure 2(b)], covered with a photomask (4) with a desired pattern and exposed [Figure 2(c)]. The resist in the exposed part is washed off with a developer to form a resist pattern (5) [Figure 2(d)]. The metal film (2) is etched with an etching solution [Figure 2(e)]. The residual resist pattern (5) on the metal film is washed off with a solvent to obtain synthetic resin plate (1) with a metal film pattern copied with the photomask pattern [Figure 2(f)]. The synthetic resin plate with the metal film pattern is etched by oxygen reactive ion etching or oxygen plasma treatment [Figure 2(g)], then the metal film (6) is removed by an etching solution to complete a synthetic resin device (7) with the photomask (4) pattern [Figure 2(h)].

[0008]

Metals that can be coated on the synthetic resin plate should be those that have good adhesive properties to synthetic resins and can be etched easily, such as aluminum, copper, chromium, nickel, etc., while aluminum is especially preferred. The pattern drawn on the photomask has a gap of 1-1000  $\mu\text{m}$ , preferably 5-50  $\mu\text{m}$  (microscopic observation) in the form of parallel lines, wavy curves, concentric circles, lattices, rectangles, circles, etc., connected by parallel straight lines in circuit shape, simple to complex patterns.

[0009]

#### Operation

Important factors for promoting growth of nerve fiber on the synthetic resin plate include hydrophilicity and hydrophobicity of the synthetic resin surface. The hydrophilicity and hydrophobicity can be represented by the contact angle of a water droplet on the synthetic resin plate. It has been known that when synthetic resin is subjected to oxygen reactive ion etching or oxygen plasma treatment, oxygen is introduced into the surface, resulting in increased hydrophilicity. A synthetic resin plate having optimum hydrophobicity for the growth of nerve fiber when no treatment is made is subjected to oxygen reactive ion etching or oxygen plasma treatment for etching of only the fine grooves to obtain a device capable of controlling nerve fiber growth, with ridge parts with optimum hydrophobicity for nerve fiber growth and hydrophilic grooves not suitable for such growth. It has been known that the tricyclodecanyldimethyldiacrylate resin plate used in the example described later has a contact angle of 68° decreasing to 23° by oxygen reactive ion etching.

[0010]

#### Application example

A tricyclodecanylmethyldiacrylate resin plate 2 cm in length, 2 cm in width and 0.5 mm in thickness was vacuum-deposited with aluminum vapor to a thickness of about 0.1  $\mu\text{m}$ . The vacuum vapor deposition conditions under resistance heating were pressure  $2 \times 10^{-5}$  Torr and vapor deposition rate 5  $\text{\AA/sec}$ . Then, photoresist AZ1350J (trade name, product of Hoechst Co.) was spin-coated then exposed through a photomask having parallel linear slits at 10  $\mu\text{m}$  gaps to 35  $\text{mJ/cm}^2$  and washed with developer AZ Developer (trade name, product of Hoechst Co.) to form a resist pattern. The exposed aluminum was removed by treating it with phosphoric acid at 40°C, and the resist pattern was removed by resist peeling liquid AZ Remover 100 (trade name, product of Hoechst Co.) to obtain a resin plate having an aluminum film pattern with 10  $\mu\text{m}$  equal spacing. The resin plate with aluminum film pattern thus formed was etched by oxygen reactive ion etching method (reaction conditions, power: 200 W, pressure: 0.1 Torr, treatment time: 3 min). The aluminum film was removed with phosphoric acid to obtain a device with a fine grooved structure of groove width 10  $\mu\text{m}$ , spacing 10  $\mu\text{m}$  and depth 1  $\mu\text{m}$ .

[0011]

This device was used for cultivating rhizoneure extracted from an adult mouse in a 1:1 mixture of Ham F-12 medium and Dulbecco MEM medium, treated with progesterone (30 mM), insulin (5 mg/L), transferrin (100 mg/L) and NGF (7S-NGF 200  $\mu\text{g/L}$ ) in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere at 37°C for 48 h, and nerve fiber growth was observed under a microscope. The nerve fiber grew on the ridge part along the groove direction. On average of 10 well extended cells, distribution of nerve fiber on the ridge was 95%. The ratio of nerve fiber length extended in the groove direction and length extended in the direction perpendicular to the groove direction was 15.1.

[0012]

#### Effects of the invention

With the device of the present invention, the growth direction of nerve fiber can be controlled more precisely than before. This device can be processed more easily than quartz glass and can be applied in medical devices such as nerve restoration materials, etc. According to the method for the manufacture of the device of the present invention, with application of micro processing technology such as lithography, reactive ion etching, etc., any number of devices of the same structure and shape can be prepared in a stable manner.

Brief description of the figures

Figure 1 is perspective diagram of the device of the present invention. Figure 2 is a cross section diagram illustrating a method for the manufacture of the device of the present invention.

Explanation of symbols

- 1 synthetic resin plate
- 2 metal film
- 3 photoresist
- 4 photomask
- 5 resist pattern
- 6 metal film printed with resist pattern
- 7 device having micro groove structure

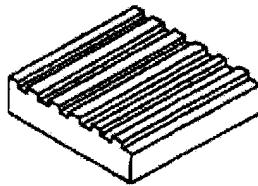


Figure 1

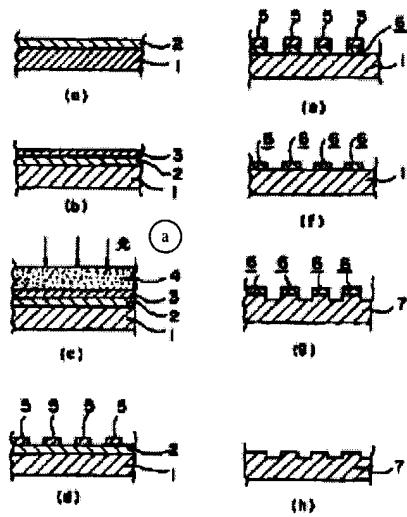


Figure 2

Key: a Light